

اثرات مصرف داروی سدیم والپروات بر قد، وزن و طول استخوانهای اندام جنین‌های متعلق به موشهای حامله تحت تزریق این دارو

دکتر فرهاد گلشن ایرانپور*

چکیده:

زمینه و هدف: داروی اسید والپروئیک (و نمک آن سدیم والپروات) یکی از داروهای مورد استفاده جهت درمان بیماری صرع است و در چند دهه اخیر بطور وسیع برای درمان بیماران صرعی بکار رفته است. چون بعضی از مادران حامله ناگزیر از مصرف دارو در طول دوران حاملگی هستند، اخیراً مطالعاتی بر روی بررسی اثرات تراوژن دارو بر جنین انجام شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات این دارو بر خصوصیات ظاهری همچون قد، وزن و نیز بر استخوانهای اندامهای جنین موش است.

روش مطالعه: جهت انجام این کار سه دوز متوالی سدیم والپروات به میزان ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به ترتیب در ساعات ۰، ۶ و ۱۲ روز نهم حاملگی موش و بصورت داخل صفاقی به ۸ موش حامله تزریق گردید. ۷ موش بارداری نیز به عنوان شاهد، تنها آب مقطر دریافت کردند. در روز ۱۸ بارداری جنین‌های هر دو دسته موش بارداری از طریق ایجاد در رفتگی گردنی برداشته شدند. ابتدا قد و وزن جنین‌ها در دو گروه اندازه‌گیری شد. پس از آن تعدادی از جنین‌های هر دو گروه جهت رنگ آمیزی آلزارین رد و آلسین بلو بکار رفتند. در این روش رنگ آمیزی بافت‌های نرم جنینی شفاف گردیده و علاوه بر آن غضروفهای جنین برنگ آبی و استخوانهای آن برنگ قرمز درمی‌آیند. در جنین‌های رنگ آمیزی شده طول استخوانهای اندامها اندازه‌گیری گردید. پس از آن اطلاعات بدست آمده در مورد قد، وزن و طول استخوانها در دو گروه شاهد و آزمایش، مرتب گردیده و با استفاده از آزمون آماری t مقایسه گردیدند.

نتایج: با اندازه‌گیری قد و وزن در دو گروه، میانگین قد و وزن در گروه آزمایش بطور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود. علاوه بر آن طول استخوانهای ران، درشتنی، نازک نی، بازو، زند زیرین، زند زیرین در دو گروه اختلاف معنی‌داری داشتند و در گروه آزمایش کمتر بودند.

نتیجه‌گیری: استفاده از سدیم والپروات در زمان بارداری موش می‌تواند سبب کاهش قد و وزن و نیز عقب افتادن رشد استخوانهای اندامها در جنین گردد و لذا بایستی از مصرف آن در دوران بارداری خودداری کرد.

واژه‌های کلیدی: سدیم والپروات، داروهای ضد صرع، جنین موش.

مقدمه:

اسید والپروئیک یکی از داروهای ضد صرع است که از سال ۱۹۷۶ در اروپا و ۱۹۷۸ در آمریکا	طول دو دهه اخیر در درمان مبتلایان به صرع مورد استفاده قرار گرفته است. این دارو در مقایسه با دیگر
اجازه مصرف یافت (۲۵) و بعد از آن بطور وسیع در	داروهای ضد تشنج دارای مزایای چشمگیری است و

*استادیار گروه تشریح - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد: رحمتیه - دانشکده پزشکی - گروه علوم تشریح - تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۳۵۶۷۵۴.

Email:fgolshaniranpour@yahoo.com

بیشتر بصورت نمک سدیم یعنی سدیم والپروات مصرف می‌شود (۱۸،۶).

در طول سالیان اخیر، تعداد قابل توجهی از گزارشات بالینی و تحقیقاتی، سدیم والپروات را با افزایش احتمالی ناهنجاری‌های جنینی مربوط دانسته‌اند. علاوه بر آن برخی از مطالعات نیز حاکی از اثر سدیم والپروات بر میزان قد و وزن زمان تولد هستند (۱۰،۴). محققین با بررسی سوابق بیماران پی بردند که این دارو یک تراژون انسانی است و سبب اختلالات لوله عصبی و به خصوص Spina Bifida Aperta می‌گردد (۲۰،۱۹،۸). همزمان با این بررسی‌ها در انسان، مشاهده گردید که با استفاده از سدیم والپروات در دوزهای بالا و در موشهای حامله، اختلالات دیگر لوله عصبی از قبیل اگزینسفالای ایجاد می‌گردد (۲۶،۱۵،۹،۱). بعداً مشخص گردید که در موش با استفاده از اسید فولیک می‌توان میزان وقوع اگزینسفالای را کاهش داد (۲۳،۲۲،۱۲). بعضی از محققین نیز متوجه شدند که دارو سبب بروز بعضی ناهنجاریها مانند اکتروداکتیلی در اندامهای موش می‌گردد (۲۱،۱۶،۱۴).

Diliberti در سال ۱۹۸۴ سندرم والپروات جنینی را به صورت تغییر شکل ناچیز صورت، هیپوسپادیاس در تعداد زیادی از نوزادان، استرابیسموس، کاهش میزان تولد و عقب افتادگی روانی حرکتی توصیف کرد (۳). قابل ذکر است که با وجود تمام تحقیقات صورت گرفته، مکانیسم القای ناهنجاری توسط سدیم والپروات هنوز ناشناخته است. عوامل احتمالی افزایش ناهنجاریهای جنینی شامل مداخله دارو در متابولیسم گلوکوتایون، متابولیسم چربیها، غلظت فولیت جنینی و ایجاد تغییرات نسبتاً زیاد در pH جنین و نیز اثر دارو بر کاهش متیونین و نیز گلوکوتایون فرم احیاء هستند (۱۷،۱۵،۷).

به هرحال ضرورت درمان صرع در ۰/۴ درصد از زنان باردار بوسیله سدیم والپروات و مطالعات اندکی که در مورد اثرات دارو بر سیستم اسکلتی جنین و بخصوص استخوان‌های اندام‌های جنین وجود داشت ما را بر آن داشت تا با استفاده از روش رنگ‌آمیزی آلزارین رد و آلسین‌بلو جنین‌ها را شفاف نموده و اثرات دارو را بر روی طول استخوان‌های اندام‌ها بررسی نماییم.

مواد و روشها:

موش‌های بالغ نر و ماده نژاد Swiss White به مدت دو هفته جدا از یکدیگر نگهداری شدند. حرارت در طول مدت نگهداری حدود ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد بود و موش‌ها ۱۲ ساعت در روشنایی و ۱۲ ساعت در تاریکی قرار داشتند. در مرحله جفت‌گیری، موش‌های نر و ماده بمدت ۳ ساعت نزد یکدیگر نگهداری شدند. در روز بعد از جفت‌گیری، با تشخیص پلاک واژینال زمان جفت‌گیری به عنوان ساعت صفر روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. در روز نهم بارداری، وزن مادران باردار در گروه آزمایش اندازه‌گیری شد و دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی سدیم والپروات محلول در آب (تهیه شده از Sigma آلمان) در سه تزریق متوالی بصورت داخل صفاقی به این مادران تزریق گردید. فواصل تزریق دارو ۶ ساعت بود و در واقع تزریق در ساعات ۰، ۶ و ۱۲ روز نهم انجام پذیرفت. لازم به تذکر است که به تعدادی از موش‌های باردار نیز به عنوان شاهد تنها آب مقطر تزریق شد. در روز ۱۸ حاملگی با ایجاد در رفتگی گردنی مادران باردار متعلق به هر دو گروه کشته شدند و جنین‌های ایشان خارج گردید. بطور کلی ۷ موش باردار برای نمونه‌های شاهد در نظر گرفته شد. در طی برداشتن جنین‌ها از این مادران ۶۴ جنین زنده بدست آمد. از ۶۴

روش رنگ آمیزی آلزارین رد و آلسین بلو: در این روش خاص رنگ آمیزی، امعاء و احشاء جنین ها خارج شده و نمونه ها توسط پتاس کاملاً شفاف می گردند. با استفاده از این روش تنها غضروفها و استخوانها رنگ می گیرند. بدین ترتیب که غضروفها برنگ آبی و استخوانها برنگ قرمز در می آیند (۱۶). اندامهای جنین ها در زیر استریو میکروسکوپ (Olympus) و با عدسی چشمی مدرج جهت اندازه گیری طول استخوانها مورد بررسی قرار گرفتند.

جنین زنده ۲۰ جنین با رنگ آمیزی آلزارین رد و آلسین بلو شفاف گردیدند و ۴۳ جنین هم در فیکساتیو بوئنز فیکس گردیدند. جهت بررسی اثرات دارو هم ۸ موش حامله مورد استفاده قرار گرفتند. از این ۸ موش، ۶۲ جنین زنده بدست آمد. از ۶۲ جنین بدست آمده ۲۸ جنین شفاف شدند و ۳۴ جنین دیگر هم فیکس گردیدند. اندازه گیری قد جنین ها با استفاده از کولیس و با دقت یک صدم سانتیمتر و اندازه گیری وزن جنین ها با ترازوی با دقت یک صدم گرم انجام گردید.

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین مقادیر طول استخوانهای اندامها در دو گروه شاهد و آزمایش

نام استخوان	گروه	تعداد	انحراف معیار \pm میانگین
ران راست	شاهد	۲۰	$3/62 \pm 0/14$
	آزمایش	۲۸	$2/85 \pm 0/22$
درشت نی راست	شاهد	۲۰	$3/16 \pm 0/11$
	آزمایش	۲۸	$2/37 \pm 0/69$
نازک نی راست	شاهد	۲۰	$2/93 \pm 0/11$
	آزمایش	۲۸	$2/06 \pm 0/64$
بازوی راست	شاهد	۲۰	$4/04 \pm 0/19$
	آزمایش	۲۸	$3/45 \pm 0/22$
زند زیرین راست	شاهد	۲۰	$2/95 \pm 0/21$
	آزمایش	۲۸	$2/18 \pm 0/48$
زند زیرین راست	شاهد	۲۰	$4/10 \pm 0/24$
	آزمایش	۲۸	$3/05 \pm 0/64$
ران چپ	شاهد	۲۰	$3/55 \pm 0/13$
	آزمایش	۲۸	$2/85 \pm 0/24$
درشت نی چپ	شاهد	۲۰	$3/49 \pm 0/23$
	آزمایش	۲۸	$2/35 \pm 0/69$
نازک نی چپ	شاهد	۲۰	$3/24 \pm 0/20$
	آزمایش	۲۸	$2/14 \pm 0/67$
بازوی چپ	شاهد	۲۰	$4/06 \pm 0/14$
	آزمایش	۲۸	$3/32 \pm 0/68$
زند زیرین چپ	شاهد	۲۰	$3/05 \pm 0/25$
	آزمایش	۲۸	$2/11 \pm 0/64$
زند زیرین چپ	شاهد	۲۰	$4/04 \pm 0/25$
	آزمایش	۲۸	$2/98 \pm 0/90$

* میانگین مقادیر در دو گروه دارای تفاوت معنی دار ($P < 0/001$) است.

نتایج:

همانطور که قبلاً نیز اشاره گردید در این مطالعه برای بررسی آثار سدیم والپروات از دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم دارو، در روز نهم حاملگی استفاده شد. تعدادی از جنین ها در هر دو گروه شاهد و آزمایش فیکس شدند و پس از آن دو فاکتور قد و وزن در آنها اندازه گیری شد. برای مقایسه اختلاف میانگین قد و وزن در این دو گروه از آزمون t (Student t-test) استفاده شد.

قد: میانگین قد در گروه آزمایش ۱۵/۶ و در گروه شاهد ۲۱/۵ میلیمتر است که این اختلاف میانگین در دو گروه دارای اختلاف معنی دار ($P < 0/0001$) است.

وزن: با بررسی وزن جنین های متعلق به دو گروه، مشخص گردید که میانگین وزن در گروه شاهد ۱/۲ و در گروه آزمایش ۰/۸ گرم می باشد که به طور معنی داری کمتر از گروه شاهد است ($P < 0/0001$).

طول استخوانهای اندامها: همانطور که اشاره گردید، طول استخوانها بوسیله استریومیکروسکوپ و با کمک عدسی چشمی مدرج اندازه گیری شد. این کار در ۲۰ جنین گروه شاهد و ۲۸ جنین گروه آزمایش انجام پذیرفت. در هر جنین، طول استخوانهای بازو، زند زیرین، زند زیرین، ران، درشتنی و نازکنی در هر دو اندام راست و چپ اندازه گیری شد. سپس اطلاعات مربوط به هر گروه مرتب گردید. جهت بررسی آماری و اطمینان از توزیع نرمال داده ها آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد استفاده قرار گرفت. در مواردی که توزیع داده ها نرمال بود از آزمون t (Student t-test) و در غیر اینصورت از تست Mann-Witney برای بررسی اختلاف میانگین استفاده گردید.

بدین ترتیب بر اساس جدول شماره یک میانگین طول تمامی استخوانهای در نظر گرفته شده در

گروه آزمایش کمتر از گروه شاهد بود و تفاوت میانگین آنها از لحاظ آماری نیز معنی دار ($P < 0/0001$) بود.

بحث:

سدیم والپروات (اسید والپروئیک) دارای خصوصیات ضد تشنج در انواع مختلف صرع است (۲). بررسی های محققین مشخص نموده است که در صورت مصرف این دارو در زمان بارداری احتمال وقوع ناهنجاری های جنینی در انسان (۱۹،۱۳،۱۲،۸) و مهره داران پائین تر (۲۴،۱۷،۵) افزایش می یابد. دانشمندان با بررسی نوزادان و پیگیری سوابق بیماران دریافته اند که این دارو سبب اختلالات لوله عصبی بخصوص Spina Bifida Aperta (باز بودن قسمت خلفی قوس مهره ای همراه با بیرون زدگی نخاع و مننژ) در جنین می گردد (۴). ما نیز در بررسی قبلی خود با اندازه گیری فاصله قوس های خلفی در گروه های شاهد و آزمایش و مقایسه آنها، دریافتیم که این دارو سبب ایجاد Spina Bifida Occulta در جنین موش می گردد (۱).

چون تعدادی از خانم های باردار به علت تشنج های شدید ناگزیر از مصرف دارو حتی در زمان بارداری هستند، بررسی اثرات استفاده از دارو بر جنین حائز اهمیت می باشد. با توجه به فقدان مطالعات زیاد در مورد اثرات دارو بر سیستم اسکلتی و بخصوص بر اندامهای جنین، ما در مطالعه حاضر بر آن شدیم تا با استفاده از دوزهای متوالی دارو، علاوه بر بررسی اثرات دارو بر قد و وزن جنین ها، اثرات آنرا بر استخوان های اندام های جنین موش نیز بررسی کنیم. استفاده از دوز متناوب بدلیل پائین تر بودن نیمه عمر دارو در جوندگان نسبت به انسان است. علاوه بر آن تزریق دارو در سه دوز

متوالی (با فواصل شش ساعته) و در روز نهم حاملگی انجام شد، زیرا روز نهم زمان شکل‌گیری جوانه اندامها در موش است (۱۰). همچنین بر اساس مطالعات Ehlers (۴) دارو در دوزهای ۵۰۰-۲۰۰ میلی‌گرم در نژادهای مختلف موش تراژون است. به علت آنکه نژاد مورد استفاده ما در دوزهای بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم می‌مرد و نیز دوز بالاتر از ۲۰۰ میلی‌گرم نیز سبب جذب تمامی جنین‌ها می‌گردید، از دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم جهت بررسی اثرات تراژون دارو استفاده گردید.

همانطور که در قسمت نتایج مشاهده گردید، میانگین قد و وزن جنینها در گروه آزمایش بطور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد است. نتایج مطالعه ما با نتایج بدست آمده توسط محققین دیگر در انسان و حیوانات مطابق است (۹، ۸). کاهش قد و وزن می‌تواند به علل مختلفی باشد که بعضی از محققین آنرا به علت کاهش محتوای پروتئینی کل جنین تحت اثر دارو دانسته‌اند (۱۵). برخی دیگر از محققین نیز تغییرات دژنراتیو در جفت و نیز پاره شدن عروق در لاکونا‌های مادری و در واقع تأثیر دارو بر تغذیه جنین را در این مورد مؤثر می‌دانند (۱۵). به هر حال استفاده از دارو سبب می‌گردد تا اختلالاتی در رشد جنین موش اتفاق افتاده و جنین‌هایی که مادرانشان سدیم والپروات دریافت کرده‌اند، رشد کمتری را نشان دهند. همانطور که در قسمت نتایج و از جدول شماره

یک بر می‌آید، تزریق سدیم والپروات در روز نهم حاملگی سبب کاهش معنی‌دار در میانگین طول استخوانها در اندامهای فوقانی و تحتانی گردیده‌است. تحقیق مشابهی در این مورد وجود نداشت. همانطور که اشاره گردید، تزریق قبل و یا در حین بوجود آمدن جوانه اندامها صورت گرفته است، بنابراین می‌توان گفت که سدیم والپروات بر مدل غضروفی و یا مزانشیم اولیه جوانه اندام اثر خود را گذارده است. بطور کلی با توجه به کاهش در میانگین قد و وزن در گروه آزمایش می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کاهش طول استخوانهای اندامها نیز در رابطه با کاهش قد و وزن بوده و در واقع حجم غضروف و استخوان در استخوانهای اندامهای گروه آزمایش کمتر از گروه شاهد است. در واقع وضعیت اسکلتی اندامها طوری است که رشد اندامها (و از جمله استخوانهای آنها) بعلت استفاده از داروی سدیم والپروات به تعویق افتاده و عقب‌تر از نمونه‌های شاهد می‌باشد. پس بطور کلی استفاده از دارو در روز نهم حاملگی موش سبب اختلال در رشد جنین می‌گردد و با توجه به موارد مذکور می‌توان گفت که استفاده از داروی سدیم والپروات می‌تواند سبب کاهش قد و وزن و نیز کاهش رشد اندامها در جنین موش گردد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از همکاری صمیمانه کارکنان دفتر مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد قدردانی می‌نمایم.

منابع:

۱. گلشن ایرانپور فرهاد؛ رضازاده مجتبی؛ حسینی احمد. اثرات داروی والپروات سدیم بر رشد ستون مهره‌های جنین موش. یافته، ۲: ۲۰-۱۵، ۱۳۷۸.
2. Chapman A.; Keane PE. Mechanism of anticonvulsant action of valproate. Progress Neurobiol, 19, 315-20, 1982.

3. Diliberti JH.; Farndon PA.; Dennis NR.; Curvy CJ. The fetal valproate syndrome. *Am J Med Gen*, 19: 473-81, 1984.
4. Ehlers K.; Sturje H.; Nau H. Spina bifida aperta induced by valproic acid. *Teratology*, 46: 117-30, 1992.
5. Gofflot F. *In vitro* neuroteratogenicity of valproic acid and 4-en-VPA. *Neurotoxicol Teratol*, 17(4): 425-35, 1995.
6. Gugler R.; Von Unruh GE. Clinical pharmacokinetics of valproic acid. *Clin Pharmacokin*, 5: 67-73, 1980.
7. Hishida R.; Nau H. VPA-induced neural tube defects in mice. Altered metabolism of sulfur amino acids and glutathione. *Teratog Carcinog Mutagen*, 18(2): 46-61, 1998.
8. Jager-Roman E. Fetal growth, major malformations and minor anomalies in infants born to women receiving valproic acid. *J Pediatr*, 108: 997-1004, 1986.
9. Kao J.; Brown A.; Schmid B. Teratogenicity of valproic acid. *Teratog Carcinog Mutagen*, 1: 367-82, 1981.
10. Kaufman MH. The atlas of mouse embryo: From Academe Press. Philadelphia: USA, 495-8, 1992.
11. Kimmel CA.; Trammel C. A rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone in fetal and adult animals. *Stain Tech*, 56: 271-3, 1981.
12. Lindhout D.; Meinardi H. Spina Bifida and in-uteri exposure to valproate. *Lancet*, 11: 396-401, 1984.
13. Lindhout D.; Schmidt D. In-uteri exposure to valproate and neural tube defects. *Lancet*, 1: 1392-3, 1987.
14. Menegola E.; Broccia ML.; Prati M.; Giavini E. Morphological alterations induced by sodium valproate on somites and spinal nerves in rat embryos. *Teratology*, 59(2): 110-19, 1992.
15. Nau H. Pharmacokinetics of valproic acid and its metabolites in pregnant patient. In: Janz D (ed). *Epilepsy, pregnancy and the child: From Raven Press*. New York: USA, 131-44, 1981.
16. Okada A.; Kurihara H.; Aoki Y.; Bailer M.; et al. Amidic modification of valproic acid reduces skeletal teratogenicity in mice. *Birth Defects Res*, 71(1): 47-53, 2004.
17. Padmanmbhan R.; Shafiullah MM. Amelioration of sodium valproate-induced neural tube defects in mouse fetuses by maternal folic acid supplementation during gestation. *Congenit. Anom Kyoto*, 43(1): 29-40, 2003.
18. Pinder RM.; Brogden RN.; Speight TM. Sodium Valproate a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in epilepsy drug in epilepsy. *Drugs*, 13: 81-7, 1977.
19. Robert E.; Guibaud P. Maternal valproic acid and congenital neural tube defects. *Lancet*, 11: 937-42, 1982.
20. Robert E.; Rosa F. Valproate and birth defects. *Lancet*. 11: 1142-50, 1983.
21. Scott WJ.; Schreiner CM.; Nau H.; Vorhees CV.; et al. Valproate-induced limb malformations in mice associated with reduction of intracellular pH. *Reprod Toxicol*, 11(4): 483-93, 1997.

22. Shin JH.; Shiota K. Folic acid supplementation of pregnant mice suppresses heat-induced neural tube defects in the offspring. J Nutr, 129(11): 2070-3, 1999.
23. Spiegelstein O.; Merriweather MY.; Wicker NJ.; Finnel RH. Valproate-induced neural tube defects in folate-binding protein 2 (Folbp 2) knockout mice. Birth Defects Res, 67(12), 974-8, 2003.
24. Spiegelstein O.; Chatterjie N.; Alexander G.; Finell RH. Teratogenicity of valproate conjugates with anticonvulsant activity in mice. Epilepsy Res, 57(2-3): 145-52, 2003.
25. Wilder BJ.; Karas BJ. Valproate, relation of plasma concentration to seizure control. In: Penry JK (eds.). Antiepileptic drugs woodbury DM: From Raven Press. NewYork: USA, 591-9, 1982.
26. Wlodarczyk B.; Biernacki B.; Minta M. Teratogenic action of antiepileptic drug: 2-propylpentanotic acid (valproic acid) effects on rat and hamster embryos cultured *in vitro*. Ginekol Pol, 72(12): 955-60, 2001.